

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.164

TUYỂN CHỌN CHẤT MANG ĐỂ TỒN TRỮ VI KHUẨN *Rhodococcus* sp. XL6.2 CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY BENZENE, TOLUENE VÀ XYLENE

Nguyễn Thị Phi Oanh¹, Võ Phát Tài¹, Nguyễn Ngọc Mẫn², Nguyễn Văn Qui³, Châu Tú Uyên³, Nguyễn Hoàng Khoa⁴ và Nguyễn Đắc Khoa^{5*}

¹Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Học viên ngành Sinh thái học K27, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Học viên ngành Công nghệ Sinh học K28, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Sinh viên ngành Sinh học K43, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

⁵Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Đắc Khoa (email: ndkhoa@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

Benzene, toluene and xylene (BTX) are the main components of gasoline and have been extensively used as solvents for industrial activities. Due to their water solubility, BTX are commonly detected pollutants in water. Rhodococcus sp. XL6.2 capable of effectively degrading BTX was isolated from a laboratory wastewater treatment system. The aim of this study was to select suitable carrier material for the storage of Rhodococcus sp. XL6.2 that can be applied for producing bioformulation to remove BTX in wastewater. Six carrier materials including bagasse, sawdust, rice bran, rice straw, talc powder and coffee grounds were used singly or jointly to form 11 carriers for storing strain XL6.2. Data obtained from plate count and GC-FID analysis indicated that talc powder was able to maintain the viability ($>10^6$ CFU/g) and BTX degradability ($>92\%$) of Rhodococcus sp. XL6.2 during 6 months of storage. In comparison to the control treatment, the supplementation of vitamin B12 to bacterial suspension played a role in maintaining higher cell viability in the tested bioformulation.

TÓM TẮT

Benzene, toluene và xylene (BTX) là thành phần chính của xăng và là dung môi được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp. Do có khả năng hòa tan trong nước nên BTX cũng được xem là một trong những hợp chất gây ô nhiễm nước phổ biến. Dòng vi khuẩn Rhodococcus sp. XL6.2 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm có khả năng phân hủy hiệu quả BTX. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm chất mang phù hợp để tồn trữ vi khuẩn Rhodococcus sp. XL6.2 làm cơ sở cho việc sản xuất chế phẩm sinh học xử lý BTX trong nước thải. Sáu loại vật liệu làm chất mang gồm bã mía, hạt gạo, cám, rơm, bột talc và bã cà phê được sử dụng riêng lẻ hoặc phối trộn để tạo 11 chất mang. Kết quả đếm sống và phân tích sắc ký khí GC-FID cho thấy bột talc duy trì mật số ($>10^6$ CFU/g) và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn Rhodococcus sp. XL6.2 ($>92\%$) trong 6 tháng tồn trữ. Vitamin B12 được bổ sung giúp vi khuẩn đạt mật số cao hơn so với nghiệm thức đối chứng.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 11/04/2022

Ngày nhận bài sửa: 25/05/2022

Ngày duyệt đăng: 21/06/2022

Title:

Selection of carrier material for storing Rhodococcus sp. XL6.2 capable of degrading benzene, toluene and xylene

Từ khóa:

Benzene, chất mang, Rhodococcus sp. XL6.2, sự phân hủy, toluene, xylene

Keywords:

Benzene, carrier material, degradation, Rhodococcus sp. XL6.2, toluene, xylene

1. GIỚI THIỆU

Hydrocarbon có một nhân thơm như benzene, toluene và xylene (BTX) hiện diện trong nhiên liệu hóa thạch, là thành phần chính của xăng và là dung môi được sử dụng phổ biến trong công nghiệp như sản xuất sơn, nhuộm vải, in ấn,... Do có khả năng hòa tan trong nước (Saheed & Al-Mutairi, 1999) nên BTX được xem là một trong những hợp chất gây ô nhiễm phổ biến đối với nước mặt và nước ngầm (Anneser et al., 2008).

Hiện nay, ứng dụng các tác nhân sinh học, đặc biệt là vi khuẩn bản địa, đang được tập trung nghiên cứu để xử lý các chất gây ô nhiễm do tính bền vững và thân thiện với môi trường. Vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* phần lớn là vi khuẩn không gây độc, trong đó một số dòng được nghiên cứu để xử lý các chất ô nhiễm môi trường. Các nghiên cứu ở cấp độ phân tử cho thấy vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* có bộ gen với kích thước dao động từ 5,4 đến 10,1 Mbp mang các gen mã hóa cho các protein hoặc enzyme tham gia vào các lộ trình phân hủy hydrocarbon mạch thẳng, hydrocarbon vòng thơm, nitrile, cholesterol và lignin (Kim et al., 2018). Các gen này thường hiện diện trên plasmid nên chúng có thể được trao đổi với các vi khuẩn khác trong môi trường sống (horizontal gene transfer) (Springael & Top, 2004). Chính vì vậy, vi khuẩn thuộc chi *Rhodococcus* được xem là một trong những vi sinh vật công nghiệp thích hợp trong nghiên cứu ứng dụng để xử lý các hợp chất hữu cơ gây ô nhiễm môi trường (Martínková et al., 2009; Kim et al., 2018).

Để ứng dụng giải pháp sinh học trong xử lý nước thải, các loại chế phẩm sinh học được nghiên cứu nhằm duy trì mật số và hoạt tính chuyên biệt của vi khuẩn trong thời gian tồn trữ (Heijnen & Veen, 1991). Thành phần chất mang, nhiệt độ, độ ẩm và thời gian tồn trữ quyết định hiệu quả của chế phẩm (Kremer & Peterson, 1983; Sparrow & Ham, 1983). Đặc biệt, việc tuyển chọn chất mang có vai trò quan trọng trong quá trình tồn trữ vi khuẩn. Theo Sahu and Brahmprakash (2016), chất mang phải có khả năng giữ nước, không vón cục, giá thành thấp, đồng nhất về tính chất vật lý và hóa học, có thể khử trùng, dễ phân hủy sinh học, pH gần trung tính, hỗ trợ sự tăng trưởng và sống sót của vi khuẩn nhờ có sẵn chất dinh dưỡng, dễ phối trộn và đóng gói.

Cho đến nay, nhiều loại chất mang khác nhau đã được nghiên cứu để tồn trữ vi khuẩn như than bùn, vỏ đậu phộng xay, cùi bắp xay, than hoạt tính, khoáng vermiculite hoặc gel polyacrylamide (Sparrow & Ham, 1983), bã cà phê (Chilosi et al., 2020). Ngoài ra, sự phối trộn các loại chất mang

cũng giúp gia tăng khả năng sống sót của vi khuẩn (Sahu & Brahmprakash, 2016). Ở đồng bằng sông Cửu Long, các vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp cũng được nghiên cứu làm chất mang để tồn trữ vi khuẩn. Chẳng hạn, bã mía được phối trộn với than bùn để tồn trữ vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (Điệp, 2008). An và ctv. (2017) đã nghiên cứu nhiều loại chất mang khác nhau như cám, gạo xay, lúa xay, trấu xay, bột talc để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus*. Nghĩa và Thur (2017) đã chứng minh vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 duy trì được mật số và khả năng phân hủy propoxur khi được tồn trữ trong bã cà phê. Tiến và ctv. (2019) đã thử nghiệm năm loại chất mang gồm cám, bột talc, than bùn, trấu và mùn cưa để tồn trữ xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus*.

Dòng vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải phòng thí nghiệm có khả năng phân hủy trên 97% từng hợp chất trong hỗn hợp BTX ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy trong môi trường pH 7 và 8 ứng với nồng độ từng chất là 0,1% (v/v) (Oanh & Triệu, 2017; Oanh và ctv., 2022). Chính vì vậy, nghiên cứu này được tiếp tục thực hiện nhằm tìm chất mang phù hợp để tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2, khảo sát khả năng duy trì mật số và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn trong chế phẩm theo thời gian tồn trữ.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khảo sát đường tăng trưởng của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2

Mục tiêu của thí nghiệm nhằm xác định thời gian vi khuẩn XL6.2 tăng trưởng đạt mật số tối ưu làm cơ sở cho việc thu sinh khối vi khuẩn ở thời điểm thích hợp trong các thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm được tiến hành như sau: Một khuẩn lạc của dòng vi khuẩn XL6.2 được chủng vào 4 mL môi trường Tryptone soya broth (TSB: 30 g/L Tryptone soya broth), mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30 - 32°C) trong 24 giờ. Sau đó, 100 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn (OD_{600nm} = 0,8) được chủng vào 100 mL (tỉ lệ 0,1%) môi trường TSB. Mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 36 giờ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Mật số vi khuẩn (MSVK) ở thời điểm 0, 6, 12, 18, 24, 30 và 36 giờ nuôi cấy được xác định bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt (Hoben & Somasegaram, 1982) trên môi trường Tryptone soya agar (TSA: 30 g/L Tryptone soya broth; 15 g/L agar) như sau: Dung dịch huyền phù vi khuẩn ở từng thời điểm thu mẫu được pha loãng bằng dung dịch đệm

phosphate buffered saline (PBS) theo hệ số pha loãng là 1/10. Các thao tác pha loãng và trộn mẫu bằng vortex được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Ứng với mỗi độ pha loãng, ba giọt huyền phù vi khuẩn (10 μ L/giọt) được nhỏ lên môi trường TSA. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Vi khuẩn được ủ ở 32°C. Khi khuẩn lạc phát triển, độ pha loãng có các khuẩn lạc rời rạc trên môi trường nuôi cấy được chọn để đếm số lượng khuẩn lạc. MSVK trong 1 mL mẫu được xác định theo công thức:

$MSVK/mL = A \times B \times 100$, trong đó, A là số lượng khuẩn lạc trung bình trong mỗi giọt đếm sống ở độ pha loãng đã chọn, B là hệ số pha loãng, 100 là hệ số chuyển đổi từ 10 μ L sang 1 mL.

2.2. Xác định mối liên hệ giữa MSVK và giá trị mật độ quang (OD_{600nm}) của dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2*

Mục đích của thí nghiệm là thiết lập đường chuẩn về mối liên hệ giữa số lượng tế bào trong dung dịch huyền phù vi khuẩn (bằng phương pháp đếm sống) và giá trị mật độ quang (OD_{600nm}) tương ứng từ đó có thể định lượng nhanh mật độ vi khuẩn thông qua các giá trị mật độ quang (JoVE Science Education Database. *Microbiology*, 2022). Thí nghiệm được tiến hành như sau: Một khuẩn lạc của dòng vi khuẩn XL6.2 được chủng vào 4 mL môi trường Tryptone soya broth, mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Sau đó, 100 μ L dung dịch huyền phù vi khuẩn ($OD_{600nm} = 0,8$) được chủng vào 100 mL (tỉ lệ 0,1%) môi trường TSB. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không có chủng vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Dung dịch huyền phù vi khuẩn được thu tại thời điểm vi khuẩn đạt mật số cao nhất dựa vào kết quả ở Mục 2.1.

Sau khi thu mẫu, 1,5 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn được cho vào ống eppendorf và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó loại bỏ phần dịch lỏng. Tiếp theo, 1,5 mL dung dịch đệm PBS được cho vào phần sinh khối tế bào và trộn đều sinh khối với dung dịch bằng vortex, tiếp tục ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút và loại bỏ phần dịch lỏng. Bước này được lặp lại 3 lần nhằm loại bỏ các thành phần của môi trường nuôi cấy. Sinh khối tế bào sau khi rửa bằng dung dịch PBS được trộn đều trong 1,5 mL PBS để tạo dung dịch huyền phù vi khuẩn.

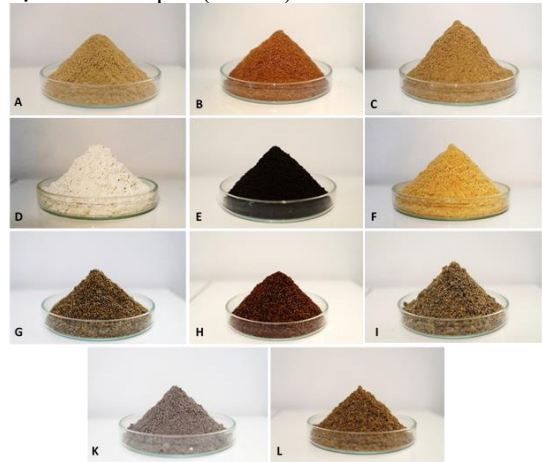
Để đảm bảo đếm được MSVK trong các dung dịch huyền phù tương ứng với các giá trị OD_{600nm}

thấp, trước tiên, dung dịch huyền phù vi khuẩn được pha loãng bằng dung dịch đệm PBS theo hệ số 1/2. Sau đó, các dung dịch huyền phù vi khuẩn tiếp tục được pha loãng theo hệ số 1/10, nhỏ giọt trên môi trường TSA, đếm sống và xác định MSVK như mô tả ở Mục 2.1. Mật độ quang (OD_{600nm}) của mỗi dung dịch huyền phù vi khuẩn ứng với từng độ pha loãng trước khi đếm sống cũng được xác định.

2.3. Tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2* trong chất mang

Trong thí nghiệm này, 6 loại chất mang gồm bã mía, hạt cưa, cám, rom, bột talc và bã cà phê được thử nghiệm để tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2* nhằm tuyển chọn chất mang duy trì mật số và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn trong sáu tháng tồn trữ.

Sáu loại chất mang được sử dụng đơn lẻ hoặc phối trộn bã cà phê với 5 loại chất mang còn lại để tồn trữ vi khuẩn. Như vậy, 11 loại chất mang được sử dụng để tồn trữ vi khuẩn XL6.2 gồm bã mía, cám, hạt cưa, rom, bột talc, bã cà phê, bã mía-bã cà phê, cám-bã cà phê, hạt cưa-bã cà phê, rom-bã cà phê, bột talc-bã cà phê (Hình 1).



Hình 1. Các loại chất mang được sử dụng để tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2*

A: cám, B: hạt cưa, C: rom, D: bột talc, E: bã cà phê, F: bã mía, G: bã mía-bã cà phê, H: bã cà phê-hạt cưa, I: bã cà phê-rom, K: bã cà phê-bột talc, L: bã cà phê-bã mía

Chuẩn bị chất mang: Rom, bã mía được rửa sạch, sấy khô 48 giờ ở 65°C và xay nhuyễn. Hạt cưa, cám và bã cà phê được sấy khô 24 giờ ở 65°C. Sau đó, từng loại chất mang được sàng qua rây (kích thước lỗ 0,5 x 0,5 mm) để chất mang có kích thước đồng đều. Talc ở dạng bột nên không qua xử lý. Mười một loại chất mang được chuẩn bị gồm 5 chất

mang đơn như bã mía, mật cưa, cám, rơm, bột talc, bã cà phê và 5 chất mang hỗn hợp được phối trộn từ 5 chất mang đơn với bã cà phê theo tỉ lệ 1:1 (Hình 1).

Tạo chế phẩm: Mười một loại chất mang được phối trộn với carboxymethyl cellulose (CMC) và CaCO₃ theo tỉ lệ 1000 g chất mang : 10 g CMC : 15 g CaCO₃ (Vidhyasekaran & Muthuamilan, 1995). Sau khi trộn đều, 5g hỗn hợp từng loại chất mang được cho vào mỗi túi nylon nhỏ. Các túi nylon chứa chất mang được dán miệng túi bằng băng keo, cho vào túi nylon lớn hơn và cố định bằng dây thun. Các túi chất mang được khử trùng nhiệt ướt 2 lần, sau đó được sấy ở 40°C trong 24 giờ và để nguội.

Chuẩn bị dung dịch huyền phù vi khuẩn: Một khuẩn lạc vi khuẩn XL6.2 được chủng vào 4 mL môi trường TSB, mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong 24 giờ. Sau đó, 100 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn (OD_{600nm} = 0,8) được chủng vào 100 mL (tỉ lệ 0,1%) môi trường TSB. Nghiệm thức đối chứng là môi trường TSB không chủng vi khuẩn. Mẫu được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Dung dịch huyền phù vi khuẩn được thu ở thời điểm vi khuẩn đạt mật số tối ưu dựa vào kết quả của thí nghiệm ở Mục 2.1. Ngoài ra, 0,001 mg/L vitamin B12 (He et al., 2007) cũng được bổ sung vào dung dịch huyền phù vi khuẩn ngay trước khi phối trộn vi khuẩn vào 11 loại chất mang để khảo sát hiệu quả duy trì mật số và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn XL6.2. Với cách bố trí này, vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 được tồn trữ và khảo sát trong 22 nghiệm thức chất mang: 11 nghiệm thức chất mang có bổ sung vitamin B12 và 11 nghiệm thức đối chứng không bổ sung vitamin.

Phối trộn vi khuẩn vào chất mang: 500 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 (mật số 2,4x10⁸ CFU/mL) được phối trộn vào từng túi chất mang 5 g (tương đương 24x10⁶ CFU/g chế phẩm). Mỗi loại chất mang sau khi phối trộn vi khuẩn được lấy ngẫu nhiên 3 túi để xác định độ ẩm bằng thiết bị phân tích độ ẩm (Kern DAB 100-3, Germany). Chế phẩm có độ ẩm dưới 20% thì đạt yêu cầu (Bharathi et al., 2004). Sau đó, các túi chế phẩm được ép chân không, dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Nghiệm thức đối chứng đối với từng chất mang được phối trộn với 500 µL môi trường TSB. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Thời gian lấy chỉ tiêu để đếm MSVK và khảo sát khả năng phân hủy BTX là 6 lần, mỗi lần cách nhau 1 tháng.

Xác định mật số và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 trong thời gian tồn trữ: Sau mỗi tháng tồn trữ, đối với mỗi loại chất mang, lấy ngẫu nhiên 3 túi chế phẩm để khảo sát mật số và khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn XL6.2 trong thời gian tồn trữ. Ba túi đối chứng cũng được kiểm tra đồng thời để khẳng định chất mang, môi trường TSB không bị nhiễm trong quá trình thí nghiệm. Mỗi túi chế phẩm được cho vào bình tam giác thể tích 100 mL có chứa 45 mL dung dịch đệm PBS. Hỗn hợp được lắc tròn 200 vòng/phút trong 30 phút, sau đó hỗn hợp được để lắng 30 phút. Hỗn hợp sau khi lắng được chia làm 2 lớp, chất mang bên dưới và dung dịch huyền phù vi khuẩn bên trên. Dung dịch huyền phù vi khuẩn được sử dụng để xác định số lượng tế bào vi khuẩn còn lại trong chất mang bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt và khảo sát khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2.

Khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn sau khi tồn trữ được khảo sát bằng cách bổ sung 400 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn thu được sau khi để lắng vào 3,6 mL môi trường khoáng tối thiểu (MM) lỏng có bổ sung hỗn hợp BTX với nồng độ từng hợp chất là 0,1%. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung vi khuẩn. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn có bổ sung BTX được lắc tròn 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Ở thời điểm 24 giờ, mẫu được thu và xác định khả năng phân hủy hỗn hợp BTX của vi khuẩn bằng phương pháp sắc ký khí (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector, GC-FID). Thành phần môi trường MM gồm 1,4196 g Na₂HPO₄; 1,3609 g KH₂PO₄; 0,3 g (NH₄)₂SO₄; 0,0985 g MgSO₄.7H₂O; 5,75 mg CaCl₂.2H₂O; 3,2 mg Na₂.EDTA; 2,75 mg FeSO₄.7H₂O; 1,7 mg MnSO₄.H₂O; 1,16 mg H₃BO₃; 1,15 mg ZnSO₄.7H₂O; 0,24 mg CuSO₄; 0,235 mg CoCl₂.6H₂O; 0,125 mg (NH₄)₆Mo₂₄.4H₂O; 1000 mL H₂O; pH=7±0,2 (Nguyen et al., 2014).

2.4. Định lượng BTX bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID

Trích mẫu: Ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, 500 µL dung dịch huyền phù vi khuẩn ở từng nghiệm thức được thu và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại bỏ tế bào vi khuẩn. Toàn bộ dung dịch trong được chuyển vào ống eppendorf 2 mL có chứa sẵn 500 µL hexane. Dung dịch hexane được lắc tròn 200 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó, 500 µL pha lỏng phía trên (BTX còn lại trong mẫu nuôi cấy (nếu có) được hoà tan trong hexane) được hút và cho vào ống eppendorf 2 mL. Các bước trích BTX được

lặp lại bằng dung môi hexane trong 3 lần liên tiếp (Tài & Oanh, 2019).

Định lượng hydrocarbon: Hàm lượng BTX còn lại trong mẫu được định lượng bằng phương pháp sắc ký khí GC-FID (GC-2014, Shimadzu) với cột SPBTM-5 fused silica capillary column (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m). Các thông số phân tích bao gồm nhiệt độ bơm 250°C, nhiệt độ phát hiện 250°C, khí mang N₂, tốc độ dòng 1,1 mL/phút, tỉ lệ chia dòng 40, thể tích bơm 1 μ L. Chu trình nhiệt độ được thực hiện như sau: Nhiệt độ ban đầu là 50°C (giữ 5 phút), sau đó nhiệt độ được tăng dần với tốc độ 10°C/phút cho đến 200°C thì dừng lại. Thời gian lưu của benzene là 3,3 phút, toluene là 5,2 phút, *p*-xylene là 7,8 phút, *m*-xylene là 8,0 phút và *o*-xylene là 8,6 phút (Tài & Oanh, 2019). Các số liệu về hàm lượng xylene được trình bày trong phần kết quả là tổng hàm lượng của 3 đồng phân *p*-, *m*- và *o*-xylene.

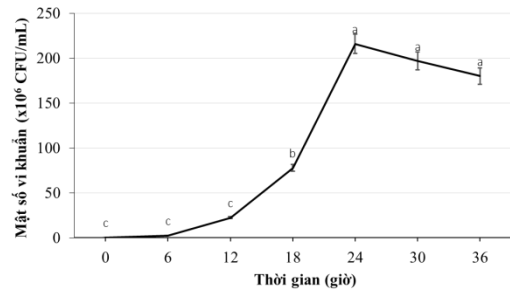
Phần mềm Microsoft Excel 2010 được sử dụng để nhập và xử lý số liệu thô, tính các trung bình và vẽ biểu đồ. Phần mềm Minitab 16 được dùng để phân tích ANOVA và trung bình của các nghiệm thức được phân tích bằng kiểm định Tukey.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đường tăng trưởng của vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2*

Sau 36 giờ nuôi cấy, MSVK *Rhodococcus sp. XL6.2* biến thiên theo đường tăng trưởng chung của vi khuẩn (Hình 2). Ở thời điểm ngay sau khi chủng (0 giờ), MSVK đạt $(0,4 \pm 0,08) \times 10^6$ CFU/mL. Ở giai đoạn tiềm phát (lag phase), vi khuẩn gia tăng mật số đến $(2,5 \pm 0,02) \times 10^6$ và $(46 \pm 5,95) \times 10^6$ lần lượt tại thời điểm 6 và 12 giờ nuôi cấy, khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 0 giờ. Sau đó, MSVK tăng nhanh (log phase), đạt $(59 \pm 12,62) \times 10^6$ CFU/mL tại thời điểm 18 giờ và đạt mật số cao nhất là $(200 \pm 28,02) \times 10^6$ CFU/mL ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 6, 12 và 18 giờ. Sau thời gian này, MSVK giảm dần tại thời điểm 30 và 36 giờ nuôi cấy, đạt $(175 \pm 10) \times 10^6$ và $(130 \pm 30) \times 10^6$ CFU/mL. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, nuôi cấy 24 giờ là thời gian vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2* đạt mật số cao nhất trong môi trường TSB. Theo Nawawi et al. (2016), khi dòng vi khuẩn phân hủy phenol *Rhodococcus sp. NAM 81* được nuôi cấy trong môi trường nutrient broth thì thời điểm vi khuẩn đạt mật độ quang và sinh khối cao nhất là 36 giờ. Sự khác biệt về thời gian đạt mật số tối đa có thể do thành phần môi trường nuôi cấy 2 dòng vi khuẩn này khác nhau.

Trong nghiên cứu này, môi trường TSB dùng để nuôi cấy vi khuẩn XL6.2 gồm tryptone, soya peptone, NaCl, dextrose và K₂HPO₄, trong khi thành phần môi trường nutrient broth để nuôi cấy vi khuẩn NAM 81 gồm peptone, beef extract, yeast extract và NaCl.

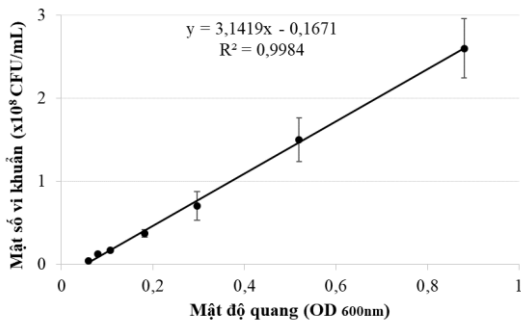


Hình 2. Đường tăng trưởng của vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2*

Các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

3.2. Liên hệ giữa MSVK và giá trị mật độ quang (OD_{600nm}) của dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2*

Từ kết quả đếm sống và giá trị OD_{600nm} của các dung dịch huyền phù vi khuẩn được pha loãng tương ứng, đường chuẩn thể hiện mối liên hệ giữa MSVK và giá trị OD_{600nm} được thiết lập. Theo đó, phương trình hồi quy có dạng $y = 3,1419x - 0,1671$. Dựa vào phương trình hồi quy có thể ước lượng được MSVK *Rhodococcus sp. XL6.2* (Hình 3), chẳng hạn, ứng với giá trị OD_{600nm} = 0,8 tương đương $2,4 \times 10^8$ CFU/mL. Kết quả này cho thấy khi chủng 0,1% dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2* (OD_{600nm} = 0,8) vào môi trường nuôi cấy thì MSVK ở thời điểm ban đầu tương đương $0,24 \times 10^6$ CFU/mL. Ở vi khuẩn *E. coli*, kết quả thiết lập mối liên hệ giữa mật độ quang và MSVK cho thấy với giá trị OD_{600nm} = 0,6350 thì MSVK là $3,6 \times 10^7$ CFU/mL (JoVE Science Education Database, 2022). Với cùng giá trị mật độ quang này thì mật số tế bào vi khuẩn *Rhodococcus sp. XL6.2* là $1,8 \times 10^6$ CFU/mL, nghĩa là MSVK *E. coli* cao xấp xỉ 20 lần MSVK *Rhodococcus sp. XL6.2*. Điều này có thể được giải thích là do sự khác nhau về kích thước tế bào vi khuẩn. Thật vậy, theo Shiomi et al. (2009), tế bào vi khuẩn Gram âm *E. coli* có hình que với kích thước dài x rộng tương ứng là 1,5 x 0,5 μ m trong khi dòng vi khuẩn Gram dương *Rhodococcus sp. XL6.2* cũng có hình que với chiều dài x rộng tương ứng là 6 x 1 μ m. Như vậy, với cùng mật độ quang, tế bào có kích thước lớn sẽ có mật số thấp hơn.



Hình 3. Mối liên hệ giữa mật số tế bào và giá trị OD_{600nm} của dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2

3.3. Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2

Kết quả khảo sát MSVK *Rhodococcus* sp. XL6.2 khi được tồn trữ trong 22 nghiệm thức gồm 11 loại chất mang: (1) bã mía, (2) cám, (3) hạt gạo, (4) rơm, (5) bột talc, (6) bã cà phê, (7) bã mía-bã cà phê, (8) cám-bã cà phê, (9) hạt gạo-bã cà phê, (10) rơm-bã cà phê và (11) bột talc-bã cà phê có hoặc không bổ sung vitamin B12 cho thấy ở thời điểm 1 tháng tồn trữ, vẫn xác định được MSVK *Rhodococcus* sp. XL6.2 trong chất mang là bột talc khi dung dịch huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12. Tuy nhiên, 10 loại chất mang còn lại không đếm được vi khuẩn. Tiếp tục khảo sát MSVK ở tháng thứ 2, 3, 4, 5 và 6 cũng cho kết quả tương tự, ta chỉ đếm được vi khuẩn khi tồn trữ trong bột talc khi huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12.

Khi được tồn trữ trong bột talc có hoặc không bổ sung vitamin B12, vi khuẩn vẫn duy trì mật số trong 6 tháng trữ. Tuy nhiên, khi bột talc được phối trộn với bã cà phê có hoặc không bổ sung vitamin B12, kết quả cho thấy không đếm được vi khuẩn khi cấy trải trên môi trường giàu dinh dưỡng TSA trong 6 tháng khảo sát. Điều này chứng tỏ bã cà phê không phù hợp đối với dòng vi khuẩn XL6.2. Thật vậy, trong chất mang là bã cà phê cũng không đếm được vi khuẩn trong 6 tháng tồn trữ. Thêm vào đó, trong các chất mang giàu carbohydrate như bã mía, cám, hạt gạo và rơm cũng không đếm được MSVK trong thời gian tồn trữ chứng tỏ các chất mang này cũng không phù hợp đối với vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2.

Ở thời điểm tồn trữ 1 tháng, MSVK trong nghiệm thức bột talc và bột talc có bổ sung vitamin B12 vào huyền phù vi khuẩn đạt lần lượt là

27,89x10⁶ và 174 x10⁶ CFU/g. Từ tháng thứ 2 đến tháng thứ 6, MSVK giảm dần, tuy nhiên, vi khuẩn vẫn duy trì mật số trên 10⁶CFU/g, trong đó, vi khuẩn trong bột talc đạt 1,11x10⁶ CFU/g và vi khuẩn có bổ sung vitamin B12 trong bột talc đạt 2,22x10⁶ CFU/g ở thời điểm tồn trữ 6 tháng.

Ở thời điểm phối trộn vào chất mang, MSVK đạt 24x10⁶ CFU/g. Khi được tồn trữ trong bột talc, MSVK vẫn duy trì ở tháng thứ nhất, sau đó giảm dần từ tháng thứ 2 đến tháng thứ 6. Đặc biệt, ở nghiệm thức có bổ sung vitamin B12, MSVK tăng ở tháng thứ nhất, sau đó giảm từ tháng thứ 2 đến tháng thứ 6 (Bảng 1). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có sự khác biệt về MSVK khi dung dịch huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12. Ở nghiệm thức có bổ sung vitamin B12, MSVK luôn cao hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức không bổ sung vitamin B12 ở các thời điểm khảo sát. Theo Wang et al. (2007), vitamin B12 hỗ trợ hoạt động cho các enzyme nội bào nên có lẽ vitamin B12 cũng góp phần duy trì MSVK *Rhodococcus* sp. XL6.2 trong thời gian tồn trữ.

Bột talc có công thức phân tử là Mg₃Si₄O₁₀(OH)₂ với thành phần gồm 63,35% SiO₂, 31,9% MgO và 4,75% H₂O. Theo Chiền (1961), ngoài chức năng là chất mang, magie trong bột talc còn có vai trò quan trọng trong việc ổn định ribosome, màng tế bào, ADN và cần thiết cho hoạt động của các enzyme. Như vậy, khoáng chất trong bột talc rất cần thiết cho tế bào vi khuẩn. Các nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh bột talc là chất mang thích hợp để tồn trữ vi khuẩn. Chẳng hạn, Vidhyasekaran and Muthamilan (1995) đã sử dụng bột talc để tồn trữ vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* phòng bệnh ở đậu, bột talc có khả năng duy trì MSVK trong 8 tháng tồn trữ, trong đó MSVK cũng giảm dần từ tháng tồn trữ thứ hai. Nghiên cứu của An và ctv. (2017) chứng minh bột talc có khả năng tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong 6 tháng để phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa.

Đáng lưu ý là khi phối trộn huyền phù vi khuẩn với vitamin B12, MSVK XL6.2 tăng cao trong giai đoạn đầu của quá trình tồn trữ. Theo Wang et al. (2007), vitamin B12 cũng có vai trò hỗ trợ hoạt động của các enzyme nội bào. Như vậy, khoáng chất trong bột talc kết hợp với vitamin B12 có lẽ đã hỗ trợ cho sự gia tăng MSVK ở tháng tồn trữ đầu tiên. Tuy nhiên, việc tiếp tục khảo sát vai trò riêng lẻ cũng như phối hợp giữa bột talc và vitamin B12 đối với sự tăng trưởng của vi khuẩn XL6.2 là cần thiết để hiểu rõ hơn về sự tương tác này. Như vậy, trong các loại chất mang khảo sát, bột talc là chất mang phù hợp

đề tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2. MSVK được tồn trữ 6 tháng trong bột talc khi dung dịch huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12 được minh họa ở Bảng 1.

Bảng 1. Chất mang có khả năng duy trì MSVK *Rhodococcus* sp. XL6.2 qua 6 tháng tồn trữ

Thời gian tồn trữ (tháng)	MSVK ($\times 10^6$ CFU/g)	
	talc	talc + vitamin B12
1	27,89 \pm 8,57 ^b	174,44 \pm 56,01 ^a
2	12,89 \pm 1,95 ^b	42,67 \pm 8,82 ^a
3	6,89 \pm 0,69 ^b	20,22 \pm 0,69 ^a
4	3,33 \pm 0,00 ^b	8,78 \pm 1,50 ^a
5	1,44 \pm 0,19 ^b	4,33 \pm 0,67 ^a
6	1,11 \pm 0,19 ^b	2,22 \pm 0,19 ^a

Trong cùng 1 hàng, các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Bảng 2. Khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn XL6.2 qua 6 tháng tồn trữ trong bột talc khi huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12

Tháng	Nghiệm thức	Nồng độ hydrocarbon còn lại (ppm)		
		Benzene	Toluene	Xylene
1	ĐC	673 \pm 92,02 ^a	735 \pm 104,33 ^a	717 \pm 102,28 ^a
	Talc	32 \pm 3,17 ^b	2 \pm 0 ^b	12 \pm 5,42 ^b
	Talc+B12	30 \pm 0,60 ^b	2 \pm 0 ^b	10 \pm 5,08 ^b
2	ĐC	715 \pm 23,67 ^a	769 \pm 29,99 ^a	750 \pm 23,08 ^a
	Talc	54 \pm 31,98 ^b	15 \pm 22,39 ^b	12 \pm 7,19 ^b
	Talc+B12	20 \pm 0,97 ^b	2 \pm 0 ^b	4 \pm 1,23 ^b
3	ĐC	696 \pm 71,74 ^a	756 \pm 42,5 ^a	716 \pm 19,94 ^a
	Talc	23 \pm 0,52 ^b	2 \pm 0 ^b	3 \pm 0,30 ^b
	Talc+B12	22 \pm 0,21 ^b	2 \pm 0 ^b	3 \pm 0,11 ^b
4	ĐC	751 \pm 63,55 ^a	748 \pm 42,54 ^a	718 \pm 24,28 ^a
	Talc	42 \pm 37,36 ^b	26 \pm 41,61 ^b	23 \pm 31,21 ^b
	Talc+B12	20 \pm 0,75 ^b	2 \pm 0 ^b	5 \pm 1,11 ^b
5	ĐC	708 \pm 15,60 ^a	750 \pm 16,18 ^a	736 \pm 8,06 ^a
	Talc	20 \pm 0,17 ^b	2 \pm 0 ^b	6 \pm 0,52 ^b
	Talc+B12	20 \pm 0,18 ^b	2 \pm 0 ^b	4 \pm 0,41 ^b
6	ĐC	698 \pm 8,66 ^a	691 \pm 17,04 ^a	669 \pm 19,90 ^a
	Talc	20 \pm 0,33 ^b	2 \pm 0 ^b	6 \pm 0,59 ^b
	Talc+B12	20 \pm 0,25 ^b	2 \pm 0 ^b	4 \pm 0,47 ^b

ĐC: đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Trong cùng một thời điểm khảo sát và đối với từng hợp chất, các số liệu đi kèm chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

4. KẾT LUẬN

Sáu loại vật liệu gồm bã mía, mật cưa, cám, rom, bột talc và bã cà phê được sử dụng riêng lẻ hoặc phối trộn để nghiên cứu tồn trữ vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 có khả năng phân hủy BTX. Trong các loại chất mang khảo sát, bột talc được chứng minh có khả năng duy trì mật số (>10⁶ CFU/g chẻ phẩm) và đặc tính phân hủy BTX của vi khuẩn XL6.2 (>92%)

Kết quả khảo sát cho thấy vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 được tồn trữ trong bột talc vẫn duy trì khả năng phân hủy BTX trong 6 tháng khi dung dịch huyền phù vi khuẩn có hoặc không bổ sung vitamin B12. Trong thời gian khảo sát, hiệu suất phân hủy trung bình đối với từng hợp chất trong hỗn hợp BTX khi dung dịch huyền phù vi khuẩn có và không bổ sung vitamin B12 đạt lần lượt trên 95% và 92% ở thời điểm 24 giờ nuôi cấy với nồng độ từng hợp chất là 0,1% (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn XL6.2 có khả năng phân hủy trên 97% từng hợp chất trong hỗn hợp BTX khi được nuôi cấy 24 giờ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung 0,1% nồng độ từng hợp chất (Oanh và ctv., 2022). Như vậy, hiệu suất phân hủy BTX của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 sau khi được tồn trữ 6 tháng trong bột talc khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với trước khi tồn trữ.

trong 6 tháng tồn trữ. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi được bổ sung vitamin B12, vi khuẩn XL6.2 duy trì mật số cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, khả năng phân hủy BTX của vi khuẩn ở cả 2 nghiệm thức không khác biệt. Chính vì vậy, bổ sung vitamin B12 vào dung dịch huyền phù vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2 khi tồn trữ vi khuẩn trong

bột talc là cần thiết nhằm đảm bảo MSVK được duy trì cao trong chế phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ thành phố

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An, Đ. H., Oanh, N. T. P., & Khoa, N. Đ. (2017). Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilis* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52b, 8-15.
- Anneser, B., Einsiedl, F., Meckenstock, R. U., Richters, L., Wisotzky F., & Griebler, C. (2008). High resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. *Applied Geochemistry*, 23(6), 1715-1730. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.02.003>
- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A., & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23, 835-843. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.007>
- Chiến, N. V. (1961). *Khoảng vật học*. Giáo trình đại học, NXB Giáo Dục Hà Nội, trang 576.
- Chilosi, G., Aleandri, M. P., Luccioli, E., Stazi, S. R., Marabottini, R., Morales-Rodríguez, C., Vettraino, A. M., & Vannini, A. (2020). Suppression of soil-borne plant pathogens in growing media amended with espresso spent coffee grounds as a carrier of *Trichoderma* spp. *Scientia Horticulturae*, 259, 108666. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108666>
- Diệp, C. N. (2008). Nghiên cứu sản xuất phân sinh học bón cho đậu nành: chất mang thích hợp cho sự sống sót của vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. *Tạp chí Khoa học*, 10, 14-24.
- He, J., Holmes, V. F., Lee P. K. H., & Alvarez-Cohen, L. (2007). Influence of vitamin B12 and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2847- 2853. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-06>
- Heijnen, C. E., & van Veen, J. A. (1991). A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiology Letters*, 85(1), 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04699.x>
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1246-1247. <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>
- JoVE Science Education Database. *Microbiology* (2022). Growth curves: Generating growth curves using colony forming units and optical density measurements. JoVE, Cambridge, MA. <https://www.jove.com/v/10511/growth-curves-generating-growth-curves-using-colony-forming-units>
- Kim, D., Choi, K. Y., Yoo, M., Zylstra, G. J., & Kim, E. (2018). Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(7), 1037-1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
- Kremer, R. J., & Peterson, H. L. (1983). Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1790-1794. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1790-1794.1983>
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nesvera, J., & Kren, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162-177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- Nawawi, N. M., Ahmad, S. A., Maniyam, M. N., & Ibrahim, A. L. (2016). Biotransformation of phenol by the resting cells of *Rhodococcus* sp. NAM 81. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 6(1), 101-107.
- Nghĩa, N. K., & Thư, T. T. A. (2017). Hiệu quả phân hủy hoạt chất thuốc trừ sâu propoxur trong đất của dòng vi khuẩn *Paracoccus* sp. P23-7 cố định trong bã cà phê. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52b, 31-40. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.121>
- Nguyen, T. P. O., Helbling, D. E., Bers, K., Fida, T. T., Wattiez, R., Kohler, H. P. E., Springael, D., & De Mot, R. (2014). Genetic and metabolic analysis of the carbofuran catabolic pathway in *Novosphingobium* sp. KN65.2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), 8235-8252. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5858-5>
- Oanh, N. T. P., & Triệu, N. V. B. (2017). Phân lập vi khuẩn phân hủy xylene từ hệ thống xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần*

- Thơ, 52a, 99-103.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2017.115>
- Oanh, N. T. P., Tai, V. P., Mẫn, N. N., Truong, B. D. T., Dương, L. T. T., & Tro, Đ. T. K. (2022). Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự phân hủy benzene, toluene và xylene (BTX) của vi khuẩn *Rhodococcus* sp. XL6.2. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Đang chờ xuất bản.
- Saeed, T., & Al-Mutairi, M. (1999). Chemical composition of the water-soluble fraction of the leaded gasolines in seawater. *Environment International*, 25, 117-129.
[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00093-2)
- Sahu, P. K., & Brahmaprakash, G. P. (2016). Formulations of biofertilizers - Approaches and advances. In D.P. Singh, H.B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* Vol. 2: Functional Applications (pp. 182-186). Springer New Delhi.
<https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>
- Shiomi, D., Mori, H., & Niki, H. (2009). Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative and Integrative Biology*, 2(3), 219-220. doi: 10.4161/cib.2.3.7930
- Sparrow, J. S. D., & Ham, G. E. (1983). Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. *Agronomy Journal Abstract*, 5(2), 181-184.
<https://doi.org/10.2134/agronj1983.00021962007500020006x>
- Springael, D., & Top, E. M. (2004). Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: New types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology*, 12, 53-58.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.12.010>
- Tài, V. P., & Oanh, N. T. P. (2019). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn trong bùn lắng của bể chứa nước thải nhà máy lọc hóa dầu có khả năng phân hủy hỗn hợp benzene, toluene và xylene. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(5A), 18-23. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2019.123>
- Tiến, N. Q., Oanh, N. T. P., & Khoa, N. Đ. (2019). Tuyển chọn chất mang để tồn trữ xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối củ hành tím. *Hội thảo Quốc gia Bệnh hại Thực Vật Việt Nam lần thứ 18*, 03-04/08/2019, trang 107-114.
- Vidhyasekaran, P., & Muthamilan, M. (1995). Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of Chickpea wilt. *Plant Disease*, 9(8), 782-786.
<https://doi.org/10.1094/PD-79-0782>
- Wang, X., Wei, L., & Kotra, L. P. (2007). Cyanocobalamin (vitamin B12) conjugates with enhanced solubility. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1780-1787.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.036>